

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

STIC-FPAS

From: Canella, Karen
Sent: Tuesday, March 05, 2002 6:35 PM
To: STIC-FPAS
Subject: foreign patent request for 09/819,193

Art Unit 1642 Location 8E12(mail)

Telephone Number 308-8362

Application Number 09/819,193

1. KR 225491, Published October 15, 1999
2. AT 407256, Published December 15, 2000

Not Available

RECEIVED
SCIENTIFIC & TECHNICAL
INFORMATION CENTER
02 MAR - 5 AM 7:13
U.S. PAT. & TM. OFFICE

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer:

AT 407 256 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1098/98
(22) Anmeldetag: 24.06.1998
(42) Beginn der Patentdauer: 15.06.2000
(45) Ausgabetag: 26.02.2001

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 5/00**

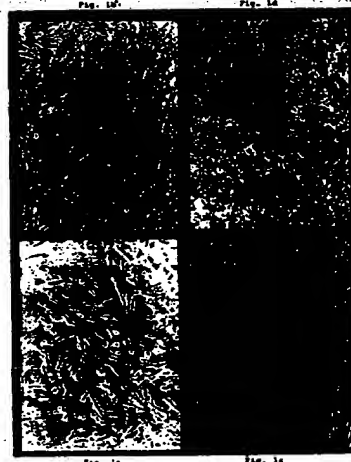
G01N 33/53, C12N 7/02, A61K 39/29

(56) Entgegenhaltungen:
EP 0414475A1

(73) Patentinhaber:
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).
(72) Erfinder:
DORNER FRIEDRICH
WIEN (AT).
EDER GERALD DR.
REKAWINKEL, NIEDERÖSTERREICH (AT).
PAVLOVA BORISLAVA DR.
WIEN (AT).
SCHAFF ZSUZSA
BUDAPEST (HU).

(54) HEPATITIS C-VIRUS POSITIVE ENDOMETRIALE ZELLINIE

(57) Es wird eine Zelllinie beschrieben, die eine endometriale Stroma-Zelllinie ist, die von mucosalem Gewebe des Uterus eines weiblichen Säugers abgeleitet ist und mit Hepatitis C-Virus infiziert ist. Die erfindungsgemäße Zelllinie kann insbesondere für die kontinuierliche Produktion von Hepatitis C-Virus, für den Nachweis von anti-HCV-Antikörpern und die Austestung von antiviralen Agentien verwendet werden.



AT 407 256 B

Die Erfindung betrifft eine erdometriale Stroma-Zelllinie, die HCV-positiv oder mit HCV infizierbar ist, ihre Verwendung zur Produktion von Viren, insbesondere von Hepatitis C-Virus, sowie die Herstellung einer HCV-Vakzine. Desweiteren betrifft die Erfindung die Verwendung der Hepatitis C-Virus-positiven Zelllinie für die Diagnose und Detektion von HCV-spezifischen Antikörpern und zur Austestung von antiviralen Agenzien.

Hepatitis C-Virus (HCV) ist das auslösende Agens für chronische non-A-, non-B-Infektionen. Das HCV gehört zur Familie der Flaviviridae und weist mit anderen Mitgliedern dieser Familie eine hohe Ähnlichkeit in der genomischen Organisation auf. Wie alle andere Flaviviren besitzt das HCV eine positive, einzel-strängige RNA von etwa 10 kb.

Die *in vitro*-Kultivierung von Flaviviridae in Zellkultur ist bisher nur in einigen Fällen gelungen. So läßt sich beispielsweise das TBEV auf serumfreien VERO-Zellen zu hohen Titern vermehren (EP 0 506 714). Die Kultivierung von Japanese Encephalitis Virus (JEV) auf VERO-Zellen wurde ebenfalls beschrieben (WO 97/04803).

Im Gegensatz dazu ist es bisher nur in einzelnen Fällen und mit unterschiedlichem Erfolg gelungen, HCV *in vitro* in Zellen zu replizieren. Da nicht jede Zelle mit HCV infizierbar ist, ist die Auswahl der für eine Infektion empfänglichen Zellen kritisch. Für die kommerzielle Anwendung ist auch wesentlich, ob eine Zelle über einen längeren Zeitraum nach Virus-Infektion fähig ist, eine Virus-Replikation zu ermöglichen und Virus zu produzieren.

HCV-Replikation in primären Leber-Zellkulturen (Carloni et al. (1993, Arch. Virol. 8:31-39. Lanford et al., 1994, Virology 202:606-614) und kontinuierlichen Zelllinien (Shimizu et al. (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5477-5481) wurde beschrieben.

Bertolini et al. (1993, Res. Virol. 144: 281-285) konnten humane B-Zellen mit HCV infizieren und positiv-strängige RNA bis zu 65 Tagen nach Infektion nachweisen. Virale HCV positiv-Strang-RNA-Sequenzen wurden nach Infektion von primären fötalen Hepatocyten bis zu 4 Wochen nach Infektion detektiert (Carloni et al. (1993, Arch. Virol. 8:31-39). Mittels Strang-spezifischer RT-PCR konnte negativ-strängige RNA bis zu 25 Tagen nach HCV-Infektion in primären Schimpansen-Hepatocyten-Zellen nachgewiesen werden (Lanford et al., 1994, Virology 202:606-614). In primären Hepatocyten-Zellen, die von einem Patienten mit chronischer Hepatitis C Virus-Infektion isoliert wurden, konnte HCV-RNA in den Zellen und im Überstand bis zu 8 Wochen nachgewiesen werden (Ito et al., 1996, J. Gen. Virol. 77:1043-1054).

Der Nachteil von primären Zellkulturen in einem ausdifferenzierten Stadium besteht jedoch darin, daß die Zellen ihre spezifischen Funktionen innerhalb von 3 bis 4 Wochen verlieren, wodurch immer wieder neue primäre Zellen für die Infektion benötigt werden.

Tagawa et al. (1995, J. Gastroenterol. Hepatol. 10:523-527) wiesen in einer humanen embryonalen Hepatocyten-Zelllinie (WRL68) über einen Zeitraum von 62 Tagen neu transkribierte RNA nach, während in einer Hepatoblastoma-Zelllinie (Hep G2) minus-Strang RNA nur über eine Periode von 39 Tagen detektiert werden konnte. Hingegen fanden Dash et al. (1997, Amer. J. Pathol. 151:363-373) in infizierten HepG2-Zellen intrazellulär negativ-strängige RNA nur innerhalb eines Zeitraums von 3 bis 60 Tagen; die Zellen starben jedoch zwischen 50 und 60 Tagen nach Transfektion.

Shimizu et al. (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6037-6041) wiesen HCV-Replikation über einen Zeitraum von 10 Wochen nach HCV-Infektion in mit Maus-Retrovirus-infizierten immortalisierten humanen T-Zellen nach.

In HCV-infizierten nicht-neoplastischen humanen Hepatocyten-Zelllinien, die mit SV40 large-T-Antigen immortalisiert wurden, konnte positiv-strängige RNA bis zu 30 Tagen nachgewiesen werden (Kato et al., 1996, Jpn. J. Cancer Res. 87:787-792). Die Verwendung von immortalisierten Hepatocyten-Zellen für die HCV-Infektion und Replikation wird ebenfalls in EP 0 527 814 und US 7 284 368 beschrieben.

Eine erfolgreiche Replikation von HCV mittels Nachweis von HCV-RNA konnte in humanen mit T-Zell-Leukämievirus-infizierten Zellen über einen Zeitraum von etwa 6 Monaten nach HCV-Infektion durch Reduktion der Kultivierungstemperatur von 37°C auf 32°C nachgewiesen werden (Mizutani et al. (1996, Biochem. Biophys. Res. Comm. 227:822-826).

Diese derart immortalisierten Zellen tragen jedoch durch die Transfektion mit einem potentiellen Onkogen ein erhöhtes tumorogenes Risiko.

Die WO 96/24662 offenbart die Adaptierung von HCV an ein Wachstum in Zellkultur und die

Infektion von nicht-lymphoblastoiden Zellen, wie beispielsweise VERO-Zellen, CV-1-Zellen oder HepG2-Zellen mit HCV, wobei bis zu 12 Tagen nach Infektion virale RNA aus den Zellen extrahiert und nachgewiesen werden konnte.

In einem isolierten VERO-Zell-Klon, infiziert mit HCV, konnten Valli et al. (1997, Res. Virol. 148:181-186) die Produktion von HCV-RNA in den Zellkulturüberstand über einen Zeitraum von 5 Monaten nachweisen. Nakajima et al. (1996, J. Virol. 70:3325-3329) konnten die Produktion von HCV RNA-Sequenzen bis zu 1 Jahr in humanen T- und B-Zelllinien nachweisen, jedoch zeigten die Ergebnisse, daß durch eine große Heterogenität von HCV-Sequenzen im Inokulum nur ein Teil der im Inokulum vorhandenen Hepatitis C-Viren absorbieren, aber nicht in den Zellen persistieren können. Sie schlußfolgerten, daß nur Hepatitis C-Viren mit einer bestimmten Sequenz in Lymphocyten replizieren können.

Die EP 0 414 475 beschreibt ein Verfahren zur Kultivierung von HCV in eukaryotischen Zellen, wobei die Beschreibung sich jedoch auf die Identifikation von viralen Replikationsintermediaten in mononuclearen Zellen des peripheralen Bluts von HCV-infizierten Patienten beschränkt. Es wird weder über eine HCV-Infektion noch über eine „in vitro“-Kultivierung von infizierten Zellen berichtet.

Für den Einsatz einer Zelllinie für die Produktion von Viren zur kommerziellen Anwendung, beispielsweise für die Herstellung einer Vakzine, für die Diagnose oder die Austestung von antiviralen Agenzien gegen diese Viren, ist daher neben der Langzeitkultivierung der infizierten Zellen, eine kontinuierliche Produktion von Titern von großer Bedeutung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Zelllinie, die über einen längeren Zeitraum eine Virusproduktion, insbesondere von Hepatitis C-Virus erlaubt, und die die oben beschriebenen Nachteile nicht aufweist, zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das Zurverfügungstellen einer endometrialen Stroma-Zelllinie, die von mucosalem Gewebe des Uterus eines weiblichen Säugers abgeleitet ist und mit Hepatitis C-Virus infiziert ist, gelöst.

Endometriale Stroma-Zellen zeichnen sich durch besondere phänotypische Oberflächenmarker aus. Dazu gehören insbesondere die Oberflächenmarker Cytokeratin und Vimentin. Endometriale Stroma-Zellen weisen dabei einen Cytokeratin-negativen und einen Vimentin-positiven Phänotyp auf, während endometriale Epithel-Zellen einen Cytokeratin-positiven und Vimentin-negativen Phänotyp besitzen. Durch Detektion der Marker kann damit die Spezifität des Zelltyps in der Zellkultur nachgewiesen werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß aus dem Uterus von HCV-infizierten Säugern Zellen isoliert werden können, die spontan immortalisieren und die als permanente Zelllinie etabliert werden können. Der Nachweis der Spezifität des Zelltyps und daß es sich bei der Zelllinie um eine Stroma-Zelllinie handelt, erfolgte dabei durch die zellspezifischen Marker Cytokeratin und Vimentin.

Die erfindungsgemäße Zelllinie zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß sie in der Lage ist, über einen längeren Zeitraum zu überleben und weiterzuwachsen. Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäße endometriale Stroma-Zelllinie für mindestens 14 Monate nach Etablierung der Zelllinie permanent lebensfähig ist, über diese Zeit HCV-positiv ist und in den Zellüberstand nachweisbar virale Nukleinsäure entläßt. Der positive Nachweis der Langzeitreplikation des Virus erfolgte dabei über RT-PCR. Bisher beschriebene Systeme erlauben eine HCV-Replikation nur bis zu höchstens 1 Jahr.

Durch die konstante Produktion von HCV in der permanenten für HCV permissiven Zelllinie ist es erstmals möglich, eine kontinuierliche Zelllinie für die HCV-Produktion zur Verfügung zu stellen.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Zelllinie aus mucosalem Gewebe des Uterus eines Hepatitis C-Virus-infizierten weiblichen Säugers gewonnen. Vorzugsweise wird die Zelllinie dabei aus Gewebe von Primaten isoliert. Es hat sich als besonders günstig gezeigt, wenn das mucosale Gewebe während des menstrualen Zyklus des weiblichen Säugers isoliert wird.

Gemäß einem besonderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine endometriale Stroma-Zelllinie mit der Bezeichnung E4 zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie wurde aus dem Mucosa-Gewebe des Uterus eines HCV-infizierten menstruierenden weiblichen Schimpansen isoliert. Dazu wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert, eine Zelleinzelsuspension hergestellt und die Zellen unter geeigneten Bedingungen kultiviert. Es wurde gefunden, daß sich als Kultivierungsmedium ein

supplementiertes Minimalmedium, versetzt mit Hydrocortison besonders gut eignet. Für die Langzeitkultivierung ist es gegebenenfalls von Vorteil, ein Antibiotikum zur Inhibierung von mikrobiellem Wachstum einzusetzen. Die isolierten Zellen werden vorzugsweise bei einer Temperatur zwischen 32°C und 37°C kultiviert und 1 x wöchentlich ein Mediumswechsel vorgenommen. Es wurde dabei

überraschenderweise gefunden, daß die derart kultivierten Zellen ein hohes Potential zur weiteren Differenzierung besitzen, über einen langen Zeitraum lebensfähig sind und über den gesamten Beobachtungszeitraum auch HCV repliziert und produziert wird.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine endometriale Stroma-Zelllinie abgeleitet von mucosalem Gewebe des Uterus eines nicht-infizierten, gesunden und pathogenfreien weiblichen Säugers bereitgestellt. Das Gewebe wird dabei vorzugsweise von einem weiblichen Uterus während des menstrualen Zyklus gewonnen. Die Zelllinie kann dabei in analoger Weise wie für die endometriale Stroma-Zelllinie aus HCV-infizierten Säugern etabliert werden.

Da es sich bei dieser erfindungsgemäßen endometrialen Zelllinie um eine Zelllinie handelt, die nicht bereits mit einem Virus infiziert ist, kann diese Zelllinie mit jedem beliebigen Virus infiziert werden, für den sie empfänglich sind, d.h. für Viren, die an die Zellen adsorbieren und in den Zellen replizieren können. Die erfindungsgemäßen Zelllinie abgeleitet vom Gewebe eines nicht-infizierten Säugers kann daher mit verschiedenen Viren infiziert werden, wobei dem Fachmann die Methoden zur Austestung der Virusempfänglichkeit bekannt sind. Die endometriale Zelllinie kann dabei mit Viren aus der Gruppe der Flaviviridae, insbesondere mit Hepatitis C Virus, der Gruppe der Herpesviren, wie etwa Cytomegalovirus, der Orthomyxoviren, wie Influenza-Virus, der Papillomaviren oder Parvoviren infiziert werden.

Die erfindungsgemäße endometriale Stroma-Zelllinie ist dabei vorzugsweise eine etablierte Zelllinie mit der Bezeichnung F13. Gemäß einem besonderen Aspekt der Erfindung ist diese Zelllinie nach Etablierung mit HCV infiziert.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird eine Zusammensetzung zum Nachweis von anti-HCV-spezifischen Antikörpern zur Verfügung gestellt. Die Zusammensetzung enthält eine *in vitro*-kultivierte HCV-positive endometriale Stroma-Zelllinie abgeleitet von mucosalem Gewebe des Uterus eines Säugers, Reagentien zum Nachweis einer Immunreaktion und als Kontrollproben HCV-positives und HCV-negatives Plasma.

In einer besonderen Ausführungsform dieses Aspekts der Erfindung sind die HCV-positiven Zellen an einem festen Träger immobilisiert. Der Träger kann dabei etwa in Form einer Mikrotiterplatte sein, bei der die Vertiefungen als Kultivierungsnapfchen benutzt werden. Die Austestung der Proben kann gemäß bekannter ELISA-Testverfahren durchgeführt werden, wobei jeweils Aliquote der zu testenden Probe, beispielsweise Humanserum, zu den immobilisierten Zellen gegeben werden und anschließend eine chromogene Substratreaktion durchgeführt wird. Es können jedoch alle im Stand der Technik bekannten Immunassays zum Nachweis der Bildung eines Antigen/Antikörperkomplexes, wie etwa ein Enzym-, Lumino-, Fluoro- oder Radioimmunassay durchgeführt werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur *in vitro*-Langzeitproduktion von Hepatitis C-Virus. Dieses Verfahren umfaßt dabei die Schritte des Bereitstellens einer HCV-positiven Zelllinie oder einer mit HCV-infizierbaren Zelllinie der oben beschriebenen Art und der Kultivierung der Zelllinie unter Bedingungen, die eine Replikation und Langzeitproduktion von HCV erlauben. Als besonders günstig hat sich dabei erwiesen, das Kultivierungsmedium in bestimmten Zeitabständen auszutauschen und die Zellen weiter zu passagieren. Unter diesen Bedingungen kann ohne Änderung der Mediumszusammensetzung während des gesamten Kultivierungs- und Virusreplikationsprozesses von über 14 Monaten kontinuierlich Virus replizieren. Die virale Replikation wird dabei mittels RT-PCR kontrolliert. In den Zellkulturüberstand freigesetzte Replikationsprodukte können beim Wechsel des Mediums aus dem gewonnenen Überstand isoliert und anschließend aufkonzentriert werden. Dabei werden hochtitrige Konzentrate erhalten, die für weitere Verwendungen eingesetzt werden können. Gewonnene Viruskonzentrate können dabei etwa für die Herstellung von Virus-Vakzinen eingesetzt werden. Das Viruskonzentrat wird dazu zur Virus-Inaktivierung entsprechend behandelt. Dies kann beispielsweise durch allgemein bekannte Methoden, wie die Inaktivierung mit Formalin, erfolgen. Anschließend wird die Präparation mit geeigneten Puffern oder Adjuvantien zu einer Vakzin-Zusammensetzung formuliert. Die

Formulierung kann dabei ebenfalls in aus dem Stand der Technik bekannter Weise erfolgen.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung umfaßt daher auch ein Verfahren zur Herstellung einer HCV-Vakzine. Die wesentlichen Schritte dieses Verfahrens umfassen dabei das Bereitstellen einer HCV-positiven Zelllinie der oben beschriebenen Art, Kultivieren der Zelllinie unter Bedingungen, die die Replikation von Hepatitis C-Virus erlauben

- Isolieren von Hepatitis C-Virus-Replikationsprodukten aus dem Zellkulturüberstand oder den Zellen
- Herstellen eines hochtitrigen Viruskonzentrats und
- Formulierung des Viruskonzentrates in einer Vakzinpräparation.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Austesten von Komponenten, die die Replikation von HCV inhibieren. Derartige anti-virale Agentien können dabei biologischen Ursprungs sein, wie beispielsweise anti-HCV-Antikörper. Es können jedoch auch neuentwickelte chemische Zusammensetzungen getestet werden. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt dabei die Schritte des Bereitstellens von (a) einer Zusammensetzung enthaltend ein potenciales HCV-antivirales Agens und (b) einer HCV-positiven Zelllinie der oben beschriebenen Art, Inkubieren der HCV-positiven Zelllinie von (b) mit einem anti-viralen Agens von (a) und dem Nachweis der Inhibierung der Replikation von HCV mittels RT-PCR.

Als HCV-positive Zelllinie ist dabei eine für HCV permissive endometriale Stroma-Zelllinie besonders bevorzugt.

Gemäß einem weiteren Aspekt umfaßt die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von HCV-spezifischen Antikörpern. Dieses Verfahren umfaßt die Schritte des Bereitstellens einer Zusammensetzung enthaltend eine HCV-positive endometriale Stroma-Zelllinie der oben beschriebenen Art, die gegebenenfalls an einen festen Träger immobilisiert ist, In-Kontakt-Bringen der Zellen mit einer Probe, die unter Verdacht steht, anti-HCV-Antikörper zu enthalten, Inkubieren der Reaktionspartner unter Bedingungen, die die Bildung eines Antigen/Antikörper-Komplexes erlauben und Nachweis des Komplexes. Die Bedingungen und die Art des Nachweises der Komplexbildung liegt dabei im allgemeinen Wissen eines Fachmannes.

Gemäß einem weiteren Aspekt umfaßt die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Zelllinien für die Produktion von Viren, vorzugsweise für die *in vitro*-Replikation von HCV.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen HCV-positiven Zelllinie zur Detektion von anti-HCV-Antikörpern.

Entsprechend einem Aspekt der Erfindung kann die erfindungsgemäße HCV-positive Zelllinie zum Nachweis eines anti-viralen Agens, beispielsweise von anti-HCV-Antikörpern oder neu entwickelten anti-HCV-Agentien eingesetzt werden.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnung näher erläutert, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein.

Dabei zeigt:

Fig. 1: Mikroskopische Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Etablierung von endometrialen Stroma-Zelllinien, abgeleitet aus mucosalem Gewebe des Uterus eines weiblichen Säugers.

Beispiel 1:

Herstellung von endometrialen Stroma-Zelllinien

Gewebe von uteraler Mucosa wurde während der Proliferationsphase des menstrualen Zyklus von 2 weiblichen Schimpansen gewonnen: das Gewebe, isoliert von einem chronisch mit HCV infizierten Schimpansen, wurde mit E4 und das von einem nicht-infizierten Schimpansen mit F13 bezeichnet. Das isolierte Mucosa-Gewebe wurde mechanisch zerstört, um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten. Anschließend wurde die Zellsuspension an einem Ficoll-Hypaque-Gradienten bei einer Dichte von 1,077 g/ml aufgetrennt. Zellen der oberen Phase des Gradienten wurden 2 x in Phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen und anschließend in Isov's modifiziertem Dulbecco's-Medium (IMDM) enthaltend 10% Hitze-inaktiviertes Pferdeserum, 10% Hitze-inaktiviertes Kälberserum, 10^{-6} mol/l Hydrocortison, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml

Streptomycin kultiviert. Die Kultivierung wurde mit 2×10^7 -Zell n/ 10 ml in 25 cm² -Gewebe-
kulturflaschen gestartet.

Die Kulturen wurden bei 37°C (5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) inkubiert und 1 x wöchentlich
ein Mediumswechsel durch Ersetzen von 50 bis 75% des Mediums durchgeführt. Sobald die
adhärenten Zellen zu 80% Konfluenz zeigten wurden die Zellen durch mechanische Behandlung
mit einem Schaber und vorsichtiges Pipettieren passagiert.

Etablierung von HCV positiven endometrial stromalen Zellen

Endometriale stromale Zellen E4 und F13 wurden ausgehend von mononuklearen Zellen vom
Uterus-Mukosa-Gewebe erhalten. Nach Entfernen der nicht-adhären Zellen durch Mediums-
wechsel, etwa am 4. Tag der Kultur, wurde eine kleiner Teil der angehefteten Einzelzellen in den
Kulturflaschen sichtbar gemacht (Fig. 1a). Am 10. Tag nach Kultivierung formten die adhären Zellen eine konfluente Schicht von Stroma-Zellen enthaltend einen hohen Anteil an Fibroblasten-
ähnlichen Zellen (Fig. 1b). Zu diesem Zeitpunkt konnten einige kleine runde Zellen (Lymphocyten)
detektiert werden, die jedoch nur einen kleinen Teil der Population darstellten. Nicht-adhären Zellen und
kleine runde Zellen konnten nur bis zum 30. Tag nachgewiesen werden. Mikroskopische
Untersuchungen der Kultur in der ersten Passage zeigte eine uniforme fibroblastische adhären Zellschicht. Die Zellverdopplung erfolgte dabei etwa alle 14 bis 21 Tage. Nach verlängerter
Kultivierung von 1 bis 2 Monaten, zeigten die Zellen von hoch-konfluenten Teilen der Kultur, die
1 Woche vorher einen konstanten fibroblasten-ähnlichen Phänotyp zeigten, zusätzlich große flache
runde Zellmorphologie (Fig. 1c und d).

Die E4-Zellen waren zu einer kontinuierlichen Kultur angewachsen, die auch ohne Zugabe von
Wachstumsfaktoren für mindestens 14 Monate weiter wuchsen. Die Proliferationsrate nahm nach
dem 7. Monat leicht ab. Diese Zellen wurden weiter passagiert und als E4-Zelllinie etabliert.

Beispiel 2:

Nachweis HCV-RNA-Sequenzen mittels RT-PCR

Um HCV-RNA zu detektieren, wurde aus 0,5 g Mucosa-Geweben, 10^7 - adhären Zellen
oder von 100 µl Zellkulturüberstand mittels der Guanidinium Thiocyanat-Phenol-Chloroform-
Extraktionsmethode Nukleinsäure isoliert (Chomczynski et al., 1987, Anal. Biochem. 162:156-159).
RT-PCR von plus- und minus-strängiger RNA wurde mittels nested RT-PCR mit Primern der
5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR) mit den externen Primern der Position 23-46 und 252-268
und den internen Primern der Position 138-168 und 234 und 248 des HCV-Genoms, wie von
Thaler et al. (1991, Lancet 338:17-18) beschrieben, durchgeführt. Jedes Experiment wurde durch
bekannte positive und negative Kontrollen validiert.

Die RT-PCR-Analyse zeigte, daß das Uterus-Mukosa-Gewebe von HCV-infizierten E4 Schim-
pansen auch nach 3-maligem Waschen mit PBS positiv für HCV-RNA war. Dies wies darauf hin,
daß die positiven Signale nicht auf eine Serum-Kontamination, sondern auf aktive HCV-Replikation
zurückzuführen ist. Die Proben des nicht-HCV-infizierten Schimpansen F13 waren hingegen
negativ für virale HCV-RNA.

Zur Detektion von viralen RNA-Sequenzen über einen längeren Kultivierungszeitraum wurde
Gesamt-RNA etwa nach einem Monat der Kultivierung und 2 Passagen von der etablierten endo-
metrialen Stroma-Zelllinie E4 und zu verschiedenen Zeitpunkten nach 1, 4, 5, 7, 12 und 14 Mona-
ten (entsprechen 2, 6, 7, 10 und 14 Passagen) aus dem Zellkulturüberstand isoliert und einer PCR-
Analyse auf HCV-spezifische RNA unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1: Nachweis von HCV-spezifischen RNA-Sequenzen in der endometrialen Stroma-
Zelllinie E4

Zeitpunkt der Kul- tivierung in Mona- ten	Passage	Isolat	HCV RT-PCR
1	2	E4-Zellen	+

Zeitpunkt der Kultivierung in Monaten	Passag	Is lat	HCV RT-PCR
4	6	E4-Überstand	-
5	7	E4-Überstand	+
7	10	E4-Überstand	++
12	14	E4-Überstand	++
14	14	E4-Überstand	++

Etwa 1 Monat nach Etablierung der endometrialen Stroma-Zelllinie E4 wurde HCV-RNA nur in den adhären Zellen gefunden, jedoch nicht im Zellkulturüberstand. Im endometrialen Zellkulturüberstand wurde HCV-RNA nur sporadisch während der ersten 5 Monate und in der 7. Passage gefunden. Die Kopienzahl der viralen Sequenzen im Überstand stieg bis zu einem Maximal-Level zwischen dem 7. und 14. Monat (entspricht der 10. und 14. Passage) nach Kultivierung an.

Die F13-Kultur, isoliert aus einem nicht-infizierten Säuger, zeigte weder in der adhären Zellschicht noch im Zellkulturüberstand positive HCV-RNA-Signale.

Beispiel 3:

Immunhistologische Färbung für Cytokeratin und Vimentin

Die Bestimmung der gewebespezifischen Marker erfolgte durch immunhistologische Detektion von Cytokeratin/Vimentin (Ramaekers et al. 1988, Advances in Immunohistochemistry. Ed. Ronald DeLellis, Raven Press, New York). Dazu wurden die Zellen auf einem Deckglas bis zur Adhärenz kultiviert und mit 4% gepuffertem Paraformaldehyd für 1 h fixiert. Monoklonale Maus-anti-human AE1/3-Antikörper gegen Cytokeratin (Serotec, Ltd. UK) und Maus-anti-human V9 Antikörper gegen Vimentin (Serotec, Ltd. UK) wurden 1:100 verdünnt und die Zellen damit inkubiert. Anschließend wurden die Antigene mit einem Fluorescein-Isocyanat (FITC) markierten zweiten Antikörper detektiert. Die Anwesenheit von Cytokeratin und Vimentin wurde in einem Fluoreszenz- und Confocal-Laserscan-Mikroskop nachgewiesen. Die cytochemische Färbung zeigte ein Cytokeratin^{negatives}/Vimentin^{positives}-Profil. Der Cytokeratin-negative/Vimentin-positive Phänotyp wies auf endometriale fibroblasten-ähnliche Stroma-Zelllinien mesenchymalen Ursprungs hin.

Beispiel 4

Elektronenmikroskopie der isolierten Zellen

Die Zellen wurden in Plastikflaschen kultiviert, in 2% Glutaraldehyd bei 4°C für 1 h fixiert, mit PBS gewaschen und in 2% OSO₄ bei 4°C für 1 h nachfixiert. Die fixierten Zellen wurden dehydriert und in PolyB-Harz (Polyscience Inc.) eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden angefertigt, mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Phillips CM10-Elektronenmikroskop mikroskopiert.

Die Fibroblasten-ähnlichen Zellen enthielten elongiertes Cytoplasma, viele dünne intermediate Filamente und einen relativ geringen Gehalt an rauhem ER und Mitochondrien. Die längeren Endothel-ähnlichen Zellen enthielten Cytoplasma, das reich an Organellen wie Mitochondrien, Lysosomen, Ribosomen und Bündel von Mikrofilamenten ist. Die Nuclei waren rund oder leicht oval und enthielten gleichmäßig verteiltes Chromatin. Charakteristische Lipidtropfen und Vakuole, assoziiert mit einem viralen Effekt, wurden in einigen Zellen gefunden.

Beispiel 5:

Detektion von Fas/Apo-1 mittels ELISA

Ein ELISA-Test von Calbiochem wurde für die Detektion von Fas/Apo-1-Proteinen im Zellkulturüberstand von E4- und F13-Zellkulturen eingesetzt. Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Kultivierung jeweils 100 µl des Zellkulturüberstandes mittels des ELISA auf

Fas-Aktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabell 2: Bestimmung der Fas-Aktivität in etablierten endometrialen Stroma-Zelllinien E4 und F13

Zeitpunkt der Kultivierung in Monaten	Passage	Fas-Aktivität in U/ml im Überstand von E4	Fas-Aktivität in U/ml im Überstand von F13
4	6	0,66	1,40
5	7	0,30	2,19
6	8	0,40	1,50
7	10	0,00	
9	11	0,40	
10	12	0,20	
11	13	0,40	
12	14	0,20	
13	14	0,50	
14	14	0,10	

Die Fas-Produktion im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten F13-Zelllinien war höher als im HCV-RNA positivem E4-Zellkulturüberstand, was auf eine Inhibierung der apoptotischen Aktivität in E4 schließen läßt. Der Gehalt an Fas im E4-Zellkulturüberstand sank parallel zur Erhöhung des Gehalts an HCV-RNA-Sequenzen ab (Tabelle 2).

Die F13-Zelllinie zeigte nach Infektion mit HCV ebenfalls einen Abfall der Fas-Aktivität und positive RT-PCR analog zur HCV-positiven E4-Zelllinie.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine endometriale Stroma-Zelllinie ist, die von mukosalem Gewebe des Uterus eines weiblichen Säugers abgeleitet ist und mit Hepatitis C-Virus infiziert ist.
2. Zelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie von mukosalem Gewebe des Uterus eines Hepatitis C-Virus infizierten weiblichen Säugers abgeleitet ist.
3. Zelllinie nach Anspruch 1 oder 2 mit der Bezeichnung E4-Zelllinie.
4. Zelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie von mukosalem Gewebe des Uterus eines nicht-infizierten weiblichen Säugers abgeleitet ist.
5. Zelllinie nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie mit einem Virus aus der Gruppe der Flaviviridae, der Herpesviren, der Orthomyxoviridae, der Papillomaviren und der Parvoviren infiziert ist.
6. Zelllinie nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Virus aus der Gruppe der Flaviviridae, ein Flavivirus oder ein Hepatitis C-Virus ist.
7. Zelllinie nach Anspruch 4 mit der Bezeichnung F13.
8. Zelllinie nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie nach Etablierung mit Hepatitis C-Virus infiziert ist.
9. Zusammensetzung zum Nachweis von anti-HCV-spezifischen Antikörpern enthaltend
 - eine HCV-positive Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
 - Reagentien zum Nachweis einer Immunreaktion
 - HCV-positives und HCV-negatives Plasma als Kontrollproben.
10. Zusammensetzung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die HCV-positive Zelllinie an einen Träger immobilisiert ist.
11. Verfahren zur "in vitro"-Langzeitproduktion von Hepatitis C-Virus umfassend die Schritte

- Bereitstellen einer HCV-positiven Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8
- Kultivieren der Zellen unter Bedingungen, die eine Replikation und Langzeitproduktion von HCV erlauben,
- gegebenenfalls Kontroll der viralen Replikation mittels RT-PCR und
- Isolieren der produzierten Viren aus dem Zellkulturüberstand.
- 5 12. Verfahren zur Herstellung einer HCV-Vakzine umfassend die Schritte
 - Bereitstellen einer HCV-positiven Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8
 - Kultivieren der Zellen unter Bedingungen, die eine Replikation von Hepatitis C-Virus erlauben,
 - 10 - Isolieren von Hepatitis C-Virus aus dem Zellkulturüberstand
 - Herstellen eines hochtitrigen Viruskonzentrats und
 - Formulierung des Viruskonzentrates in einer Vakzinpräparation.
- 13. Verfahren zum Screenen von Komponenten, die die Replikation von HCV inhibieren, umfassend die Schritte
- 15 - (a) Bereitstellen einer Zusammensetzung enthaltend ein potenciales HCV-antivirales Agens
- (b) Bereitstellen einer HCV-positiven Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8
- Inkubieren der HCV-positiven Zelllinie von (b) mit einem antiviralen Agens von (a) und
- Nachweis der Inhibierung der Replikation von HCV mittels RT-PCR.
- 20 14. Verfahren zum Nachweis von HCV-spezifischen Antikörpern umfassend die Schritte
 - Bereitstellen einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 9 oder 10
 - In-Kontakt-Bringen einer HCV-positiven Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8 mit einer Probe, die unter Verdacht steht, HCV-Antikörper zu enthalten,
 - Inkubieren der Reaktionspartner unter Bedingungen, die die Bildung eines Antigen/Antikörper-Komplexes erlauben, und
 - 25 - Nachweis einer Immunreaktion.
- 15. Verwendung einer Zelllinie nach einem der Ansprüche 4 bis 8 zur Produktion eines Virus aus der Gruppe der Flaviviren, der Herpesviren, der Orthomyxoviren, der Papillomaviren und Parvoviren.
- 30 16. Verwendung einer Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Produktion von Hepatitis C-Virus.
- 17. Verwendung einer HCV-positiven Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Detektion von HCV-Antikörpern.
- 35 18. Verwendung einer HCV-positiven Zelllinie nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Nachweis eines antiviralen Agens.

HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN

Fig. 1b.



Fig. 1d

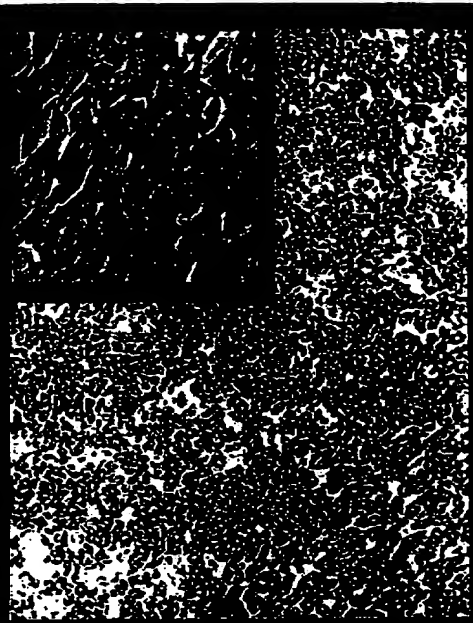


Fig. 1a

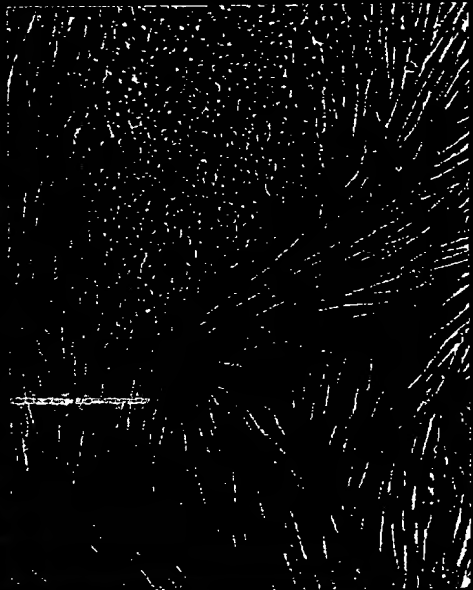


Fig. 1c